



19 Congresso de Iniciação Científica

ESTUDO DO EFEITO COMBINADO PH, CONCENTRAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO, POPULAÇÃO BACTERIANA MISTA E TEOR ALCOÓLICO NO PROCESSO DE FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Autor(es)

CAMILA PADOVAN BAPTISTA

Orientador(es)

VALMIR EDUARDO ALCARDE

Apoio Financeiro

FAPIC/UNIMEP

1. Introdução

A floculação é um fenômeno apresentado por leveduras, as quais se unem em agregados denominados flocos constituídos por várias células. A ocorrência da floculação na fermentação alcoólica pode ser causada pela presença de linhagens floculentas do gênero *Saccharomyces* e por bactérias contaminantes. Nas usinas de álcool a contaminação bacteriana é considerada a principal responsável pela floculação do fermento (ALCARDE, 2001).

Na fermentação alcoólica para se alcançar a máxima conversão do açúcar em etanol e dióxido de carbono é essencial que a levedura permaneça suspensa no mosto em contato com o substrato (SANTOS, 1991). No entanto, em determinadas circunstâncias as células de levedura tendem a aglomerar-se e formar flocos que podem se separar do meio de cultura por sedimentação, quando se depositam no fundo da dorna, ou por flotação, quando o agregado se dirige para a superfície por meio de bolhas de gás (STRATFORD, 1996). A remoção precoce das células dispersas provoca redução do rendimento e aumento do tempo de fermentação.

O mecanismo através dos quais as bactérias exercem efeito direto na floculação de leveduras não está totalmente esclarecido. Na floculação de leveduras floculentas o modelo mais aceito é o "modelo das lectinas", proposto por MIKI et al. (1982). Este modelo propõe a ocorrência de uma ligação específica entre as proteínas (lectinas) de células floculentas e os receptores de manana da parede celular de células adjacentes, requerendo ainda a presença de íons cálcio, cuja função é a de manter as lectinas em sua conformação ativa.

Para que a floculação se desenvolva é necessária a presença de íons cálcio e a agitação da suspensão de células (STRATFORD, 1989). A mudança do pH acarreta um efeito profundo na floculação (CALLEJA, 1987). ALCARDE (2001) observou que a presença de etanol no meio apresentou efeito inibitório no processo de floculação.

2. Objetivos

- Verificar as condições de ocorrência da floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* através do efeito combinado do pH, concentração de íons cálcio, população bacteriana mista contaminante e teor alcoólico no processo de produção de álcool, simulando o que ocorre no processo industrial.

- Investigar o mecanismo de floculação entre leveduras e bactérias.

3. Desenvolvimento

Para este estudo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT 134 L). Para reativação das células de levedura foi utilizado o meio de cultivo líquido YEPD (extrato de levedura-1,0%; peptona-1,0%; dextrose-2,0%).

As culturas de bactérias utilizadas nos experimentos foram: *Lactobacillus fermentum* (FT282B), *Lactobacillus plantarum* (FT025B), *Lactobacillus fructivorans* (FT091B), *Bacillus subtilis* e *Bacillus coagulans* como uma população mista destes microrganismos. Para a reativação e crescimento das culturas de *Lactobacillus* foi utilizado o meio de cultivo "De Man, Rogosa, Sharp" - MRS Difco 0881-01-3. E para a reativação e crescimento das culturas de *Bacillus* foi utilizado o meio de cultivo NB (Nutriente Líquido).

As leveduras e as bactérias foram cultivadas em caldo YEPD e MRS/NB por 24-48 horas a 30°C, utilizando como inóculo 1% de um cultivo de 24 horas em caldo. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 3600 G/10 minutos/4°C e lavadas duas vezes com solução de Na₂EDTA 0,025M, sendo posteriormente ressuspensa em água deionizada, em tampão Tris-HCl 10-1M, pH 7,0-7,5 e água destilada. Para os testes de floculação as culturas de bactérias foram misturadas em proporções iguais para compor a população mista destes microrganismos.

Para os testes de floculação foi utilizada cultura de levedura com concentração de 10% v/v, com uma população entre 1 a 5,0 x 10⁸ células de levedura/mL. Os testes de floculação foram conduzidos com população superior a 1,0 x 10⁸ células de bactéria/mL.

Os testes de floculação foram realizados de acordo com o método de STRATFORD & KEENAN (1988), adaptado para a utilização de suspensões mistas de leveduras e bactérias. Este método baseia-se na velocidade de sedimentação e clarificação do sobrenadante da suspensão de microrganismos. Desta forma adicionou-se a tubos de ensaio (16 x 150 mm) 3 mL da suspensão de leveduras, 3 mL da suspensão de bactérias e solução de CaCl₂ 5x10⁻²M em quantidade suficiente para se obter uma concentração final de 1x10⁻²M. A seguir os tubos foram agitados manualmente por 2 minutos, mantido em repouso por 10 minutos e depois, com auxílio de um pipetador automático, coletou-se 3 mL da amostra do sobrenadante, medindo-se sua absorbância em espectrofotômetro a 600nm.

Para se verificar o efeito combinado do pH, presença de íons e teor alcoólico no processo de floculação, foram realizados testes de floculação na condição de pH 4,5 e pH 3,0 na presença de Ca⁺⁺ - 400 ppm e 800 ppm, e na presença de 10% de álcool.

4. Resultado e Discussão

Para interpretação dos resultados utilizou-se a padronização de acordo com Santos (1991), considerando fortemente floculante (+++) as espécies bacterianas que proporcionaram uma leitura da absorbância inferior a 0,25, mediamente floculante (++) as leituras entre 0,25 a 0,40, fracamente floculante (+) as bactérias que proporcionaram leitura entre 0,40 a 0,65 e como não floculante (-) as leituras (absorbância) superiores a 0,65. Os testes de floculação estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1

Os resultados obtidos indicam que *Lactobacillus fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B), *Bacillus coagulans* e *B. subtilis* suspensos em tampão Tris-HCl 10-1M, pH 7,0-7,5, apresentaram capacidade de provocar a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L). O *Lactobacillus fructivorans* não apresentou capacidade floculante.

Os resultados da floculação de uma população mista de bactérias, contendo *Lactobacillus* e *Bacillus* tem poder de flocular a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L), na presença de íons cálcio, pH 7,0-7,5 e ausência de álcool no meio.

Tabelas 2 e 3

Com base nos resultados obtidos, o efeito do aumento do teor de cálcio de 400 ppm para 800 ppm em meio com presença de 10% de teor alcoólico influenciou a capacidade floculante da população mista de bactérias e da levedura testada.

Em meio apresentando pH 3,0, o aumento do teor de cálcio parece não influenciar no grau de floculação, que resultou em não floculante para 400 ppm e 800 ppm, não teve efeito promotor da floculação porém a leitura da absorbância diminuiu com o acréscimo de cálcio (800 ppm). Já em pH 4,5 a adição de íons cálcio teve efeito estimulante no processo de floculação, o grau de floculação identificado como não floculante a 400 ppm Ca⁺⁺ apresentou-se como fracamente floculante em 800 ppm Ca⁺⁺.

Em meio definido por 400 ppm de cálcio a diminuição do pH de 7,0 para 3,0/4,5 e o aumento do teor alcoólico de 0 para 10% tiveram efeito inibidor na floculação, uma vez que a leituras de absorbância encontradas para população mista de bactérias foi superior as leituras de absorbância obtidas quando não havia a presença de etanol e o pH era neutro no meio de análise.

5. Considerações Finais

Neste trabalho constatou-se que a combinação de população mista de bactérias, teor alcoólico, pH e concentração de íons cálcio é capaz de provocar a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em determinadas situações.

Em pH 3,0 e com 10% de álcool, a população mista de bactérias não apresentou efeito floculante frente à levedura, mesmo com a adição de íons cálcio. Porém em meio com pH 4,5 contendo 10% de teor alcoólico, a floculação foi intensificada pela adição de íons cálcio. Assim em concentração de cálcio de 400 ppm não houve floculação, mas com o aumento da concentração de íons cálcio para 800 ppm a leitura da absorbância diminuiu indicando o ocorrência da floculação.

Referências Bibliográficas

ALCARDE, V.E. Avaliação de parâmetros que afetam a floculação de leveduras e bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. Campinas, 2001. 91p. (Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP).

CALLEJA, G. B. Cell agregation. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. eds. The yeasts. 2.ed. London, Academic Press, 1987 v.2 p.165-238.

MIKI, B.L.A.; POON, N.H.; JAMES, A.P.; SELIGY, V.L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. v. 150 n.2 p.878-889, 1982.

SANTOS, M.T. Característica da floculação de leveduras causada por *Lactobacillus fermentum*. Campinas, 1991. 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. *Yeast*, v.5, n.6, p.487-496, 1989.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: restructuring the theories in line with recent research. *Cerevisiae*. v.21 n.1, p.38-45, 1996.

STRATFORD, M. & KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: quantification. *Yeast* 4: 107-15, 1988.

Anexos

Tabela 2: Capacidade floculante da população mista de bactérias frente à levedura FT134L, considerando o efeito combinado do pH 3,0; concentração de íons cálcio - 400 e 800 ppm e teor alcoólico - 10% na floculação

	pH 3,0 Leitura (A) 600 nm	Teor alcoólico (%)	Grau de Floculação
Teor de íons de Cálcio 400 ppm	0.805	10	-
Teor de íons de Cálcio 800 ppm	0.727	10	-

Tabela 1: Capacidade floculante de bactérias e da população mista de bactérias frente à levedura FT134L, em tampão Tris-HCl 10^{-1} M, pH 7,0-7,5

Microorganismo	Teor de íons de Cálcio (ppm)	Teor alcoólico (%)	Leitura (A) 600 nm	Grau de floculação
<i>L. fermentum</i> (FT282B)	400	-	0.319	++
<i>L. plantarum</i> (FT025B)	400	-	0.377	++
<i>L. fructovarans</i>	400	-	1.202	-
<i>B. coagulans</i>	400	-	0.444	+
<i>B. subtilis</i>	400	-	0.409	+
População mista de bactérias	400	-	0.488	+

Tabela 3: Capacidade floculante da população mista de bactérias frente à levedura FT134L, considerando o efeito combinado do pH 4,5; concentração de íons cálcio - 400 e 800 ppm e teor alcoólico - 10% na floculação

	pH 4,5 Leitura (A) 600 nm	Teor alcoólico (%)	Grau de Floculação
Teor de íons de Cálcio 400 ppm	0.650	10	-
Teor de íons de Cálcio 800 ppm	0.599	10	+